

На правах рукописи

*Оля Миянович*

**Миянович Оля**

**Влияние куркумина и глиотоксина на звездчатые клетки печени и  
портальные фибробласты крыс *in vitro***

**03.01.04 – Биохимия**

**03.03.04. цитология гистология и клеточная биология**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Казань-2014**

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, доцент **Ризванов Альберт Анатольевич**

**Научный консультант:** доктор медицинских наук, профессор **Киясов Андрей Павлович**

**Официальные оппоненты:**

**Коксин Владимир Петрович**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ГАУЗ ВПО «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ Минздрава РТ», и.о. зав. лабораторией биохимии; ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Минздрава России, старший преподаватель (г. Казань).

**Шевлюк Николай Николаевич**, доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии, ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия Минздрава РФ» (г.Оренбург)

**Ведущая организация:**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита состоится «26» июня 2014г. в 11.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008 г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, ауд.211. Телефон: 7(843)23-37-842

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» [www.kpfu.ru](http://www.kpfu.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 год

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

 **Абрамова З.И.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность проблемы*

Хронические заболевания печени, в результате которых развивается цирроз, занимают восьмое место в причинах смертности взрослого населения в мире (Martin, et. al // Hepatology. 2014.V.59; Parola, et al. // Fibrogenesis Tissue Repair. 2009. V.2). В связи с этим огромное значение имеют исследования молекулярных механизмов активации и ингибирования профиброгенного потенциала паренхиматозных и непаренхиматозных клеток печени, связей биохимических внутриклеточных процессов с деятельностью отдельных популяций клеток печени. Подобные исследования позволяют выяснить причины развития фиброза и цирроза печени и изыскать новые пути их эффективного лечения. Единственным эффективным методом лечения цирроза печени на данный момент является трансплантация донорского органа печени, но многие аспекты функционирования печени в этих условиях с биохимической и клеточной точки зрения изучены недостаточно. Именно поэтому ведутся активные поиски новых биологически активных веществ, а также проводится исследование физиологического действия уже известных лекарственных средств с целью расширения их показаний и возможностей применения в медицине, что позволит предотвратить развитие, замедлить и обратить вспять фиброз печени. Перспективными подходами представляются применение клеточной терапии стволовыми и прогениторными клетками, генная терапия, одновременно ведутся поиски новых химических соединений, оказывающих влияние на процессы образования внеклеточного матрикса (ВКМ) в печени (DeLeve, 2013 // J. Clin. Invest. 2013. Vol.5.; Isao Oakazaki, Extracellular Matrix and the Liver // book auth. 2003). Доклинические исследования различных препаратов и методов лечения включают эксперименты *in vitro* на культурах клеток. Однако, до сих пор не установлены клеточные типы, обладающие профиброгенным потенциалом и участвующие в развитии фиброза в печени (Bataller, et al // J. Clin. Invest. 2005.Vol. 2.; Diehl, et al // Journal of Clinical Investigation. 2013. Vol. 5; Yin, et. al // Journal of Clinical Investigation. 2013. Vol. 5). Не до конца выясненными остаются сигнальные пути и каскады, запускающие синтез компонентов ВКМ в ответственных клетках (Iredale, et. al // Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease. 2013. Vol.7). Исследование клеточных основ процессов фиброзирования-дефиброзирования в печени и молекулярных основ активации и ингибирования этого процесса может помочь в создании принципиально

новых подходов в лечении хронических гепатитов и их грозных осложнения фиброза и цирроза органа. Одним из перспективных подходов для успешного лечения заболеваний печени является применение биологических веществ, проявляющих антифиброзную активность. Примерами таких веществ являются куркумин и глиотоксин (Dai, et al // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013. Vol. 6; Qiu, et al // Eur J Pharmacol. 2014. Vol. 728; Tian, et al., // Molecular Medicine Reports. 2014. Vol. 9)

**Цель работы:** Характеристика молекулярно-биохимических механизмов дифференцировки, морфогенеза и апоптоза *in vitro* клеток печени с фиброгенным потенциалом в ответ на воздействие куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- $\alpha$ .

**В соответствии с поставленной целью решали следующие задачи:**

1. Получить культуры звездчатых клеток печени и портальных фибробластов методом эксплантации и ферментативной обработки из фрагментов печени и крупных портальных трактов здоровых четырёхдневных новорожденных крыс *Rattus norvegicus*.
2. Провести иммунофенотипический анализ полученных культур клеток и исследовать их способность к дифференцировке и трансдифференцировке *in vitro*.
3. Определить влияние биологически активных веществ: куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- $\alpha$ , на биохимические показатели культур звездчатых клеток печени и портальных фибробластов, в том числе и на пролиферацию, апоптоз и биосинтез компонентов цитоскелета.

#### **Научная новизна работы**

Получены приоритетные данные по дозозависимому влиянию куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- $\alpha$  на биосинтез компонентов цитоскелета звездчатыми клетками печени и портальными фибробластами, а также их пролиферацию и апоптоз. Несомненной новизной обладают данные по влиянию куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- $\alpha$  на культуры клеток портальных фибробластов из крупных портальных трактов по сравнению со звездчатыми клетками печени. Впервые проведено сравнение двух методов (эксплантация и ферментативная обработка) получения культур звездчатых клеток печени и портальных фибробластов из эксплантов печени и крупных портальных трактов четверодневных крыс. Проведен сравнительный анализ иммунофенотипа полученных культур клеток и исследована их способность к дифференцировке и трансдифференцировке *in vitro*. На основании

полученных данных впервые экспериментально показано, что не только звездчатые клетки печени, но и портальные фибробласты составляют важную фиброгенную популяцию клеток печени.

### ***Теоретическая и научная значимость***

В рамках проведенного исследования предложен новый подход для получения звездчатых клеток печени и портальных фибробластов. Метод является более простым и удобным с практической точки зрения и позволяет получать клетки для моделирования фиброза печени *in vitro*. Подобная модель может быть использована для исследования процессов фиброгенеза в печени и доклинического исследования действия различных биологически активных веществ на культуры клеток, обладающих фиброгенным потенциалом. В ходе исследования влияния куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- $\alpha$  на культуры звездчатых клеток печени из фрагментов печени и портальных фибробластов из крупных портальных трактов, были определены концентрации веществ, токсичные для клеток и обладающие антипролиферативным эффектом. Полученные данные об активации апоптоза и подавлении биосинтеза компонентов цитоскелета (один из маркеров фиброгенеза) глиотоксином и куркумином открывают перспективу применения исследуемых веществ в медицине для лечения фиброза печени.

### ***Основные положения, выносимые на защиту***

1. Антифиброзное действие куркумина и глиотоксина связано с их непосредственным апоптотическим эффектом, как на звездчатые клетки печени, так и на портальные фибробласты.
2. Портальные фибробласты, наравне со звездчатыми клетками печени, способны к дифференцировке в миофибробласты и участию в процессах фиброза.

### ***Апробация работы***

Материалы диссертации представлены на XVI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (г.Казань, 2011), XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (г.Казань, 2012), I научно-практической конференции студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии» (г.Казань, 2013), Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2014» (г.Москва, 2014).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа в объеме 137 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Диссертационная работа иллюстрирована 32 рисунка и 5 таблиц. Библиографический указатель включает 182 источников литературы (3 отечественных и 179 иностранных).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В работе использованы крысы *Rattus norvegicus*, линия Wistar, полученные из питомника лабораторных животных «ПУЩИНО», содержание и использование которых соответствовало правилам, принятым в К(П)ФУ, рекомендациям местного этического комитета (Генин А. М. и др // Авиа космическая и экологическая медицина, 2001. №4).

**Исследованные вещества:** Куркумин (*Curcuma longa* (Turmeric) Sigma (C1386): 100 мкМ, 50 мкМ, 30 мкМ; глиотоксин (*Gliocladium fimbriatum*, Sigma G9893): 0,1 мкМ; 0,05 мкМ; 0,25 мкМ ; инсулин (ПанЭко): 1000 мкМ, 500 мкМ, 200 мкМ ; TNF- $\alpha$  (PAN Biotech GmbH): 10 нг/мл, 20 нг/мл, 50 нг/мл.

**Получение эксплантационной культуры из печени крыс** проводили из здоровых четырехдневных животных, которых подвергали декапитации и обрабатывали 70% этанолом. Все последующие манипуляции проводили в стерильных условиях под бинокулярным операционным микроскопом StemiDV4 CarlZeiss (Германия). Осуществляли операционный доступ, извлекали печень, снимали Глиссонову капсулу. Паренхиму печени разделяли на фрагменты размером около 3 мм<sup>3</sup> и помещали в питательную среду DMEM с добавлением 10% FBS, 200 mM L-глутамина и антибиотика, на культуральный пластик. Фрагменты инкубировали в термостате при 37°C в атмосфере увлажненного воздуха с содержанием 5% CO<sub>2</sub>. Прижизненное наблюдение за процессом эксплантации осуществляли инвертированной световой микроскопией. На 3-и сутки фрагменты печени удаляли, а питательную среду заменяли на свежую.

**Получение эксплантационной культуры из крупных портальных трактов** и дальнейшее культивирование осуществляли аналогично описанному выше. Однако печень при этом, не извлекали.

**Получение культуры портальных фибробластов методом эксплантации после проназно-коллагеназной обработки.** Выделение

портальных трактов осуществляли по выше описанной методике. Далее порталы инкубировали 30 мин при 37°C и постоянном покачивании в растворе DMEM (ПанЭко), содержащем 0,066% коллагеназу *Clostridium hystolyticum* (Sigma), 0,055% проназу (Sigma), 0,006% дезоксирибонуклеазу (Биолот), 3% FBS, 0,1% БСА (Sigma), 10 mM HEPES и антибиотики. Полученную клеточную суспензию пропускали через 40 мкм монофиламентный сетчатый фильтр. Оставшуюся на фильтре ткань помещали в среду DMEM и инкубировали при 37°C в атмосфере увлажненного воздуха с содержанием 5% CO<sub>2</sub>.

**Фибробласты (ФБ) из кожи четырёхдневных крыс получали** в стерильных условиях, измельчая фрагменты ткани до 1–2 мм кусочков хирургическим скальпелем и помещая образцы в лунки 6-луночного культурального планшета. Затем добавляли в каждую лунку по 2 мл культуральной среды и инкубировали 7 дней при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO<sub>2</sub>. На 7 сутки культуральную среду заменяли. Через 16–21 день инкубации формировался плотный монослой клеток.

**При получении мультипотентных стромальных клеток (МСК) из костного мозга крыс** из костномозговой полости крупных трубчатых костей вымывали костный мозг раствором DPBS в стерильную пробирку, который затем гомогенизировали, центрифугировали 5 мин при 500 g. Образовавшийся осадок ресуспендировали в питательной среде  $\alpha$ -MEM и высевали на культуральный пластик.

**Пероксидазно-антипероксидазный метод.** Клетки фиксировали 10 мин 4% параформальдегидом и промывали 4 раза водопроводной водой. Для окрашивания на внутриклеточные антигены проводили 2 мин пермеабиллизацию клеточных мембран 1% Тритоном X-100. Проводили пероксидазный блок с 0,06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 мин. и промывали TBS однократно 5 мин. Затем 1 ч инкубировали с первичными антителами и промывали 3 раза по 5 мин TBS. Для визуализации результатов использовали систему Novolink (Novocastra, UK). Проявляли окрашиванием аминэтилкарбазолом (АЭК). Ядра окрашивали гематоксилином по стандартной методике.

**Иммунофлуоресцентный метод.** Фиксацию клеток в лунках культурального планшета проводили охлажденным метанол (карбинол, Тат ХимПродукт, Россия) после удаления культуральной среды, инкубируя при -20°C 10 мин. Затем клетки промывали 3 раза по 5 мин 50 mM раствором Триса, pH 7,6, включающим 150 mM (TBS). Инкубацию с первичными антителами (разведение 1:200) проводили в TBS 1 ч, затем промывали 3 раза по 5 мин в TBS и инкубировали 1 ч с вторичными антителами (разведение 1:2000 в TBS). После трёхкратной промывки по 5 мин в TBS добавляли DAPI

(4',6-diamidino-2-phenylindole, разведенный 1:50000 TBS; Invitrogen, США) и инкубировали 5 мин и повторяли отмывку TBS. Далее в лунки добавляли по 500 мкл TBS и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии AxioObserverZ1 (Carl Zeiss, Германия).

**Иммуногистологию проводили ранее опубликованным методом** ([http://www.bdbiosciences.com/resources/protocols/paraffin\\_sections.jsp](http://www.bdbiosciences.com/resources/protocols/paraffin_sections.jsp))

**Проточная цитофлуориметрия.** Клетки фиксировали 30 мин при 40°C в фиксативе CellFix, на основе формальдегида, 10 мин пермеабилizировали мембрану 0,1% раствором Твина-20 в PBS. Суспензию клеток 1 ч инкубировали с первичными антителами, затем 30 мин с вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa 488. Результаты анализировали на проточном цитофлуориметре GuavaeasyCyte 8HT.

**Исследование апоптоза методом окрашивания Annexin-V FITC и PI.** На 7-ой день культивирования к клеткам добавляли исследуемые вещества в различных концентрациях и инкубировали 24 ч. Затем клетки собирали центрифугированием 5 мин при 500 g, оставшиеся прикрепленными клетки трипсинизировали, снова собирали, после чего 1-й и 2-й осадок объединяли, промывали два раза и окрашивали Annexin-V FITC PI согласно инструкции фирмы-производителя (Sigma).

**Иммуноблотинг.** После электрофоретического разделения белковых молекул в соответствии с рекомендациями фирмы Bio-Rad Mini-PROTEIN 3 Cell. Проводили перенос белков с гелей на Immun-Blot PVDF-мембрану (Bio-Rad). Мембрану блокировали в 5% обезжиренном молоке 40 мин при комнатной температуре, а потом инкубировали - с первичными антителами при +4°C в течение ночи. Затем мембрану тщательно отмывали в PBS- Твин-20, после чего инкубировали 40 мин со вторичными антителами. Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью набора для хемилюминесцентной детекции белка Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-Sciences AB, #RPN2232) и прибора ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, Сингапур).

**Трансфекция.** Клетки трансфицировали *in vitro* плазмидными конструкциями с помощью коммерческого трансфицирующего реагента Turbofect согласно инструкции фирмы-производителя (ThermoFisher)

**xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (Roche).** (метод проводили по инструкции фирмы Roche)

**MTS-тест.** Цитотоксичность куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF-α на культурах клеток определяли колориметрически с помощью реагента CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent Powder (Promega, США) на планшетном анализаторе CERES 900HDi (Bio-Tek Instruments Inc., США). Для этого при



490 нм определяли влияние исследуемых веществ на активность митохондриальных дегидрогеназ. Статистический анализ проводили методом t-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2007.

**Дифференцировка.** Для индукции дифференцировки, осуществляемой в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях в соответствии с методом (Dogan A. et al // International Journal of Nanomedicine. 2012) клеточные культуры инкубировали со специальными средами согласно стандартном протоколу.

## **Результаты и их обсуждение**

### **1. Фенотипический анализ клеток, получаемых методом эксплантации из фрагментов печени и крупных портальных трактов новорожденных крыс**

Поскольку влияние веществ, в частности куркумина, глиотоксина, инсулина, TNF- $\alpha$ , на процессы активации /ингибирования фиброза печени невозможно исследовать без надежной модели эксплантации культуры клеток, с целью получения миофибробластов (МФ) необходимо было выполнить фенотипический анализ клеток, получаемых методом эксплантации из фрагментов печени и крупных портальных трактов новорожденных крыс.

Методов выделения ЗКП (звездчатые клетки печени), не содержащих в своей цитоплазме витамина А и находящихся на стадии МФ, в литературе не описано. Вследствие их высокой биосинтетической активности и способности трансдифференцироваться в МФ, которые синтезируют макромолекулы межклеточного матрикса соединительной ткани, ЗКП считают главными «виновниками» развития цирроза и фиброза печени (Ramadori, et al., // Liver. 2002. Vol. 22). Однако в последнее время появляется всё больше данных о том, что помимо ЗКП источником МФ могут являться фибробласты портальных трактов или ПФ (портальные фибробласты). Таким образом, на сегодняшний день обе эти популяции клеток ЗКП и ПФ рассматриваются как источник МФ и соединительной ткани при фиброзе печени (Iwaisako, et al., // J Gastroenterol Hepatol. 2012: Vol. 27).

Мы предположили, что для получения МФ с целью моделирования активации ЗКП и ПФ может быть использован метод эксплантации, при котором клетки, обладающие высокой биосинтетической активностью, мигрируют из фрагментов тканей *in vitro* с образованием монослойной культуры.

Общепринятым маркёром МФ является альфа-гладкомышечный актин ( $\alpha$ -ГМА). Отличительным признаком МФ, происходящих из ЗКП, является

сохранение в цитоскелете миофибробластов десмина. Характерным маркером ПФ является Thy-1.

На первом этапе работы были получены клеточные культуры из эксплантов печени и крупных портальных трактов. Клетки, получаемые как из фрагментов печени, так и из крупных портальных трактов, имели морфологию, характерную для МФ.

При исследовании фенотипа клеток, полученных из эксплантов печени, была показана устойчивая экспрессия десмина - маркера ЗКП крыс, что позволяет нам предположить, что мигрировавшие клетки являлись преимущественно МФ-ЗКП. (Рис. 1 А, Б).

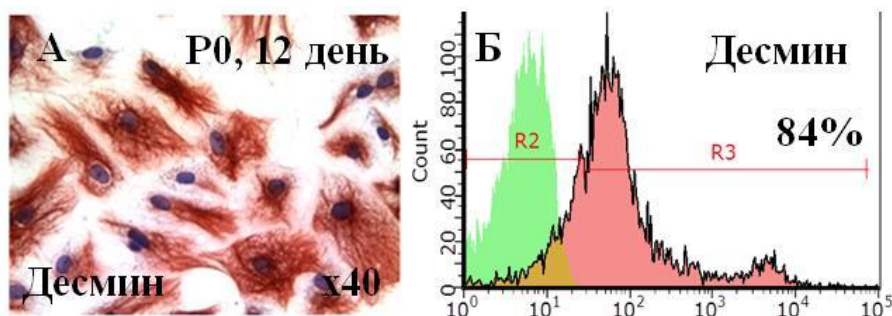


Рис.1.Иммуноцитохимический анализ клеток, окрашенных антителами на (А) Десмин,12 день, пассаж 0 (P0), x40 (увеличение), (Б) Проточная цитофлуориметрия клеток, полученных из эксплантов печени P1 (пассаж 1): – окрашивание на Десмин (зеленый пик –контроль (R2), красный- опыт (R3- 84%)).

При исследовании фенотипа клеток, полученных из крупных портальных трактов, было выявлено 81% положительно окрашенных клеток на Thy-1, что подтверждает получение МФ-ПФ (Рис.2)

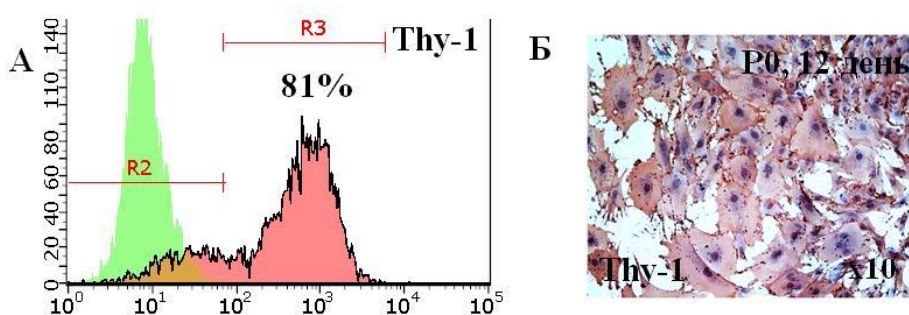


Рис.2. Проточная цитофлуориметрия клеток, полученных из эксплантов крупных портальных трактов (пассаж 1): – окрашивание на Thy-1 (зеленый пик – контроль (R2), красный- опыт (R3- 81%), (Б) Иммуноцитохимический анализ клеток полученных из крупных портальных трактов , окрашенных антителами на (А) Thy-1,12 день, пассаж 0 (P0), x 10 (увеличение).

Поскольку экспрессия цитокератинов 18 и 19 не была выявлена, можно утверждать, что полученные культуры клеток были не эпителиального происхождения. А отсутствие экспрессии альбумина и  $\alpha$ -фетопротейна было

показателем того, что полученные клетки не были зрелыми гепатоцитами (Рисунок 3).

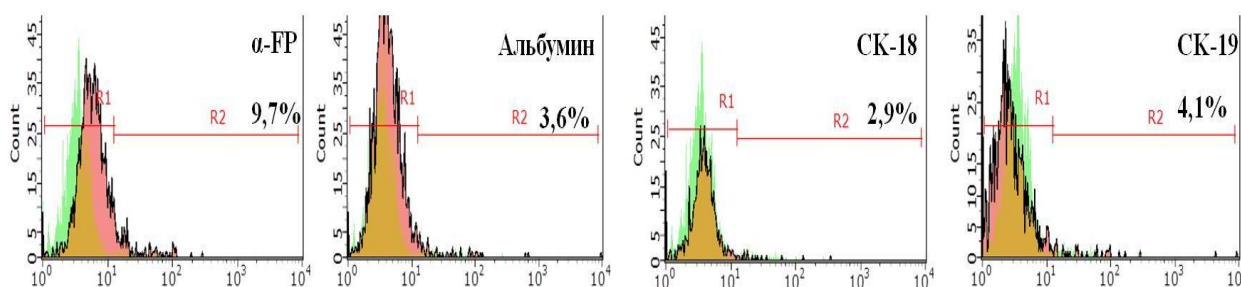


Рис. 3 - Проточная цитофлуориметрия клеток, полученных из эксплантов печени P1 (пассаж 1): — окрашивание на α-FP, Альбумин, CK-18, CK19. (зеленый пик – контроль (R2), красный- опыт (R1))

## 2. Влияние куркумина, глитоксина, инсулина, TNF- на ПФ и ЗКП, полученных из крупных портальных трактов

Исследование веществ, потенциально рассматривающихся в качестве препаратов для лечения фиброза печени, ранее проводилось на ЗКП. Учитывая участие ПФ в синтезе внеклеточного матрикса и их большой вклад в развитие фиброза печени, сравнительный анализ влияния на них и на ЗКП различных веществ, вероятно, поможет в поиске новых подходов к лечению фиброза печени. Биологически активные вещества, влияющие на эти клетки, потенциально способны модулировать процессы фиброза. Мы предположили, что использование известных ингибиторов фиброза: куркумина и глитоксина, - может влиять на пролиферацию, жизнеспособность и статус активации МФ-ПФ.

С целью выбора оптимальных концентраций было исследовано влияние широкого диапазона концентраций всех веществ на полученную культуру клеток МФ-ЗКП: куркумина 5–200 мкМ; глитоксина 0,025–30 мкМ; инсулина 10-1000 мкМ; TNF-α 1-50 нг/мл. Все вещества в указанных концентрациях добавляли через 24 ч после посева клеток, анализ их действия оценивали с помощью прибора xCELLigance Real-Time Cell Analyzer, который позволяет наблюдать влияние различных веществ на клеточный индекс в реальном времени.

На основании опубликованных данных по действию разных концентрации куркумина, глитоксина, инсулина и TNF-α на МФ-ЗКП и собственных наблюдений, были выбраны 3 оптимальные концентрации каждого вещества: куркумина - 100 мкМ, 50 мкМ и 30 мкМ, глитоксина -

0,25 мкМ 0,1 мкМ, 0,05 мкМ, инсулина -1000 мкМ, 500 мкМ и 200 мкМ и TNF- $\alpha$  - 20 нг/мл и 10 нг/мл.

При самой высокой из используемых концентраций куркумина –100 мкМ - наблюдали наиболее токсичное действие на клетки. После начального периода адаптации клеток к влиянию вещества, начинался их апоптоз, а потом и некроз, что отражено в графике косонисходящей кривой, показывающей снижение пролиферации клеток (Рис. 4 А).

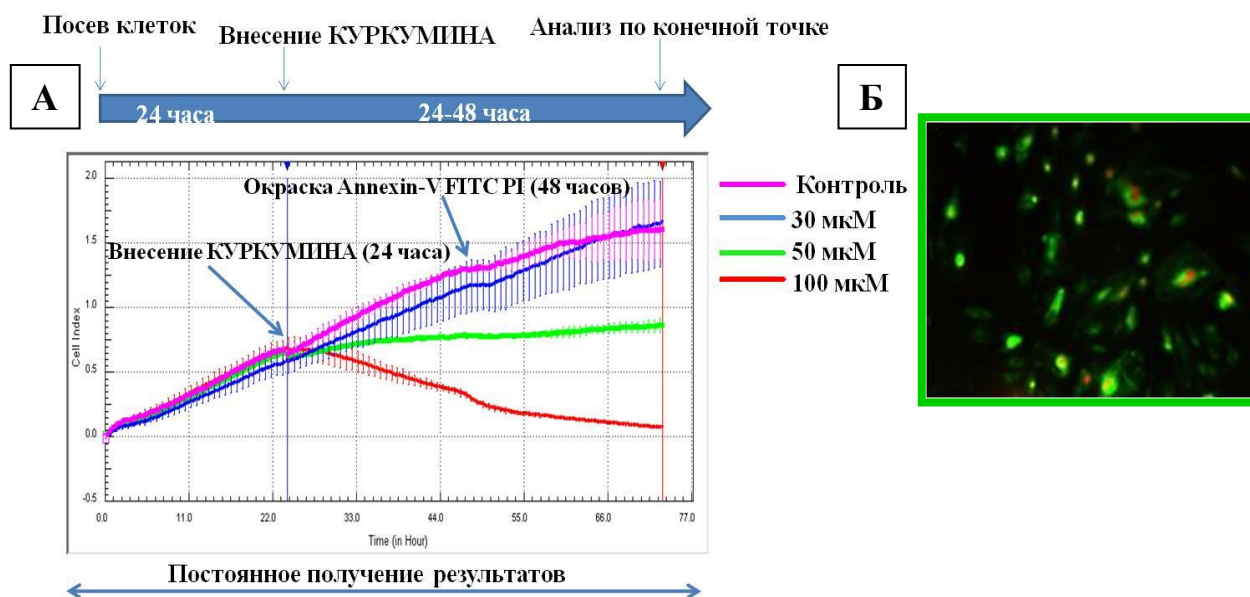


Рис. 4. (А) Исследование клеточного индекса ПФ, при добавлении куркумина. Куркумин в различных концентрациях (30 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ) добавляли в культуру клеток, и пролиферативную активность клеток определяли на основе клеточного индекса, полученного с помощью прибора xCELLigance Real-Time Cell Analyzer. (Б) Ранний апоптоз после инкубации с куркумином в концентраций 50 мкМ. Окраска красителями Annexin V-FITC (маркер апоптоза, зеленая флуоресценция) и PI (маркер некроза, красная флуоресценция), x20 (увеличение)

При добавлении средней (50 мкМ) концентрации куркумина клетки хорошо адаптировались, наблюдались лишь признаки раннего апоптоза (Рис. 4 Б). После этого клеточный индекс достигал фазы плато. Однако он был ниже по сравнению с контрольными клетками, которым ничего не добавляли (Рис. 4 А). Эту концентрацию можно считать наиболее значимой, т.к. клетки сохраняют способность к пролиферации, хотя и на более низком уровне. Видно, что рост клеток по отношению к клеткам контрольной группы снижается примерно на 50%. При самой низкой концентраций в 30мкМ практически отсутствовало влияние вещества на клеточный индекс (Рис.4 А).

По сравнению с куркумином глиотоксин оказывает более токсичное действие на ПФ. Глиотоксин добавляли к культивируемым клеткам через 48



ч. Концентрация 0,05 мкМ практически не оказывала влияния на клетки, некроза впервые 24 ч отмечено не было. Клетки на короткий промежуток времени подвергались апоптозу, а затем их рост восстанавливался, и на 72 ч культивирования их клеточный индекс был больше, чем у контрольных клеток (Рис. 5 А). Такие показатели сохранялись до конца эксперимента.

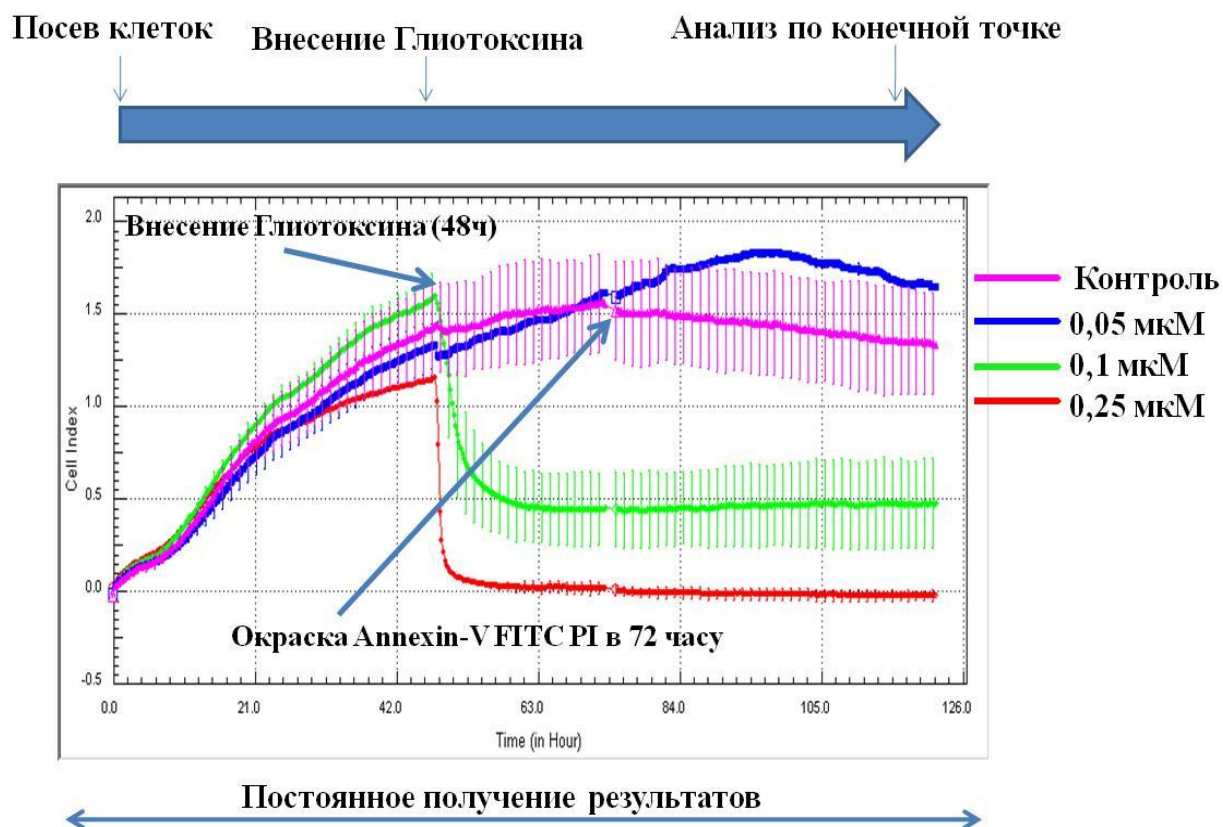


Рис. 5. Исследование клеточного индекса ПФ, при добавлении глиотоксина. Глиотоксин в различных концентрациях (0,05 мкМ; 0,1 мкМ; 0,25 мкМ) добавляли в культуру клеток (через 48 ч после посева клеток) и пролиферативную активность клеток определяли на основе клеточного индекса, полученного с помощью прибора xCELLigance Real-Time Cell Analyzer. Определение некроза/апоптоза клеток в дальнейшем проводили с помощью флуоресцентных красителей Annexin V-FITC и PI

При концентрации глиотоксина 0,1 мкМ клетки подвергались апоптозу, а частично и некрозу. Часть клеток выживала, однако роста клеточного индекса в процессе дальнейшего культивирования практически не наблюдалось. Таким образом, глиотоксин в концентрации 0,1 мкМ оказывает на клетки антипролиферативный эффект (Рис. 5 А). Концентрация 0,25 мкМ оказалась слишком токсичной и вызывала некроз исследуемых клеток (Рис. 5 А). Следует отметить, что полученные данные о токсичности веществ

актуальны для исследуемого типа клеток и зависят от концентрации и изначального их количества.

Методом проточной цитофлуориметрии показано, что при его добавлении в концентрации 0,25 мкМ 63,65% клеток погибали и 31,93% уходили в апоптоз, живыми оставались лишь 3,32% клеток (Рис. 6 Б).

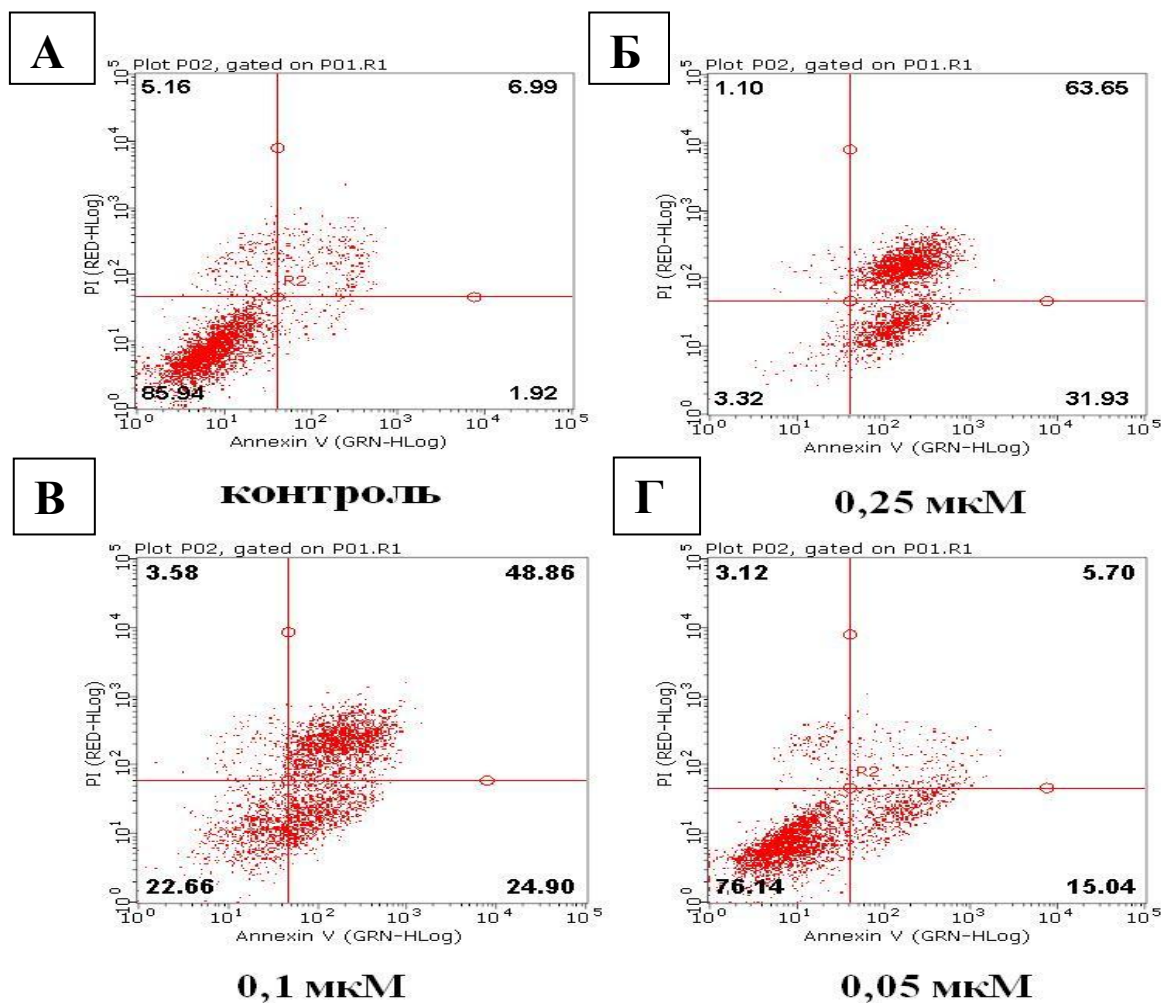


Рис. 6. Влияние глиотоксина на процессы некроза и апоптоза в ПФ. Глиотоксин добавляли в культуру клеток в концентрациях 0,05 мкМ, 0,1 мкМ и 0,25 мкМ. После инкубаций 24 ч апоптоз/некроз клеток определяли с помощью флуоресцентных красителей Annexin V-FITC (маркер апоптоза, зеленая флуоресценция) и PI (маркер некроза, красная флуоресценция). Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии

С уменьшением концентрации глиотоксина (0,1 мкМ) количество мертвых и ушедших в апоптоз клеток снижалось (48,86% и 24,90%, соответственно), и увеличивалось количество живых клеток –22,66% (Рис. В). Наименьшая из выбранных концентраций глиотоксина (0,05 мкМ) не

приводила к немедленной гибели клеток (5,70% некроза), однако апоптозу подвергалось 15,04% клеток, что почти в восемь раз превышает значение спонтанного апоптоза в контроле (1,92%-Рис.6 А), количество живых клеток при этом составляло 76,14% (Рис. 6 Г).

На основании тестов по определению активности митохондриальных дегидрогеназ были подтверждены результатами xCelligance и максимальные нетоксичные концентрации куркумина и глиотоксина.

Кроме того, было исследовано влияние веществ с противоположным эффектом: инсулина и TNF- $\alpha$  - на клетки МФ-ПФ .

Хотя инсулин является известным митогеном, действуя на клетки через специфичные рецепторы, его влияние на ПФ оставалось недостаточно изученным. В ходе исследований показано, что инсулин способствует пролиферации ПФ. Получены экспериментальные данные, которые показывают, что от самой низкой - 200 мкМ - до самой высокой - 1000 мкМ - концентрации, инсулин способствовал росту клеточного индекса (Таблица 1).

**Таблица 1.**

Влияние куркумина, глиотоксина, TNF- $\alpha$  и инсулина на МФ-ПФ крыс *in vitro*

ВЕЩЕСТВО	КОНЦЕНТРАЦИЯ	ПРОЛИФЕРАЦИЯ	$\alpha$ -ГМА	Annexin-V FITC PI	
				АПОПТОЗ	
				РАННИЙ	ПОЗДНИЙ
<b>КУРКУМИН</b>	30 мкМ	+	+++	—	+
	50 мкМ	— /+	++	+	—
	100 мкМ	—	+	—	+
<b>ГЛИОТОКСИН</b>	0,05 мкМ	— /+	+++	—	+
	0,1 мкМ	— /+	++	—	+
	0,25 мкМ	—	+	—	+
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	10 нг/мл	+	+	*	*
	20 нг/мл	++	++	*	*
<b>ИНСУЛИН</b>	200 мкМ	+	+	*	*
	500 мкМ	++	++	*	*
	1000 мкМ	+++	+++	*	*

(-) – снижение пролиферации, биосинтеза ГМА или отсутствие апоптоза.

(+) – увеличение пролиферации, биосинтеза ГМА или индукция апоптоза.

\* – не определяли

Хотя известно, что цитокин TNF- $\alpha$  обладает множеством эффектов, имеющих критическое значение в процессах регенерации, изменение роста клеток после добавления TNF- $\alpha$  в течение 24 ч практически не наблюдалось, однако после 48 ч инкубации наблюдалось увеличение пролиферативной активности по отношению к клеткам контрольной группы (Таблица 1).

Результаты, полученные в ходе нашего исследования, направленного на изучение влияния нескольких биологически активных веществ в различных концентрациях на пролиферативную активность, биосинтез компонента цитоскелета  $\alpha$ -ГМА и апоптоз МФ-ПФ, обобщены в Таблице 1.

Таким образом, исследовано действие куркумина и глиотоксина на ПФ, предложены оптимальные концентрации куркумина (50 мкМ) и глиотоксина (0,1 мкМ), которые могут быть использованы для подавления пролиферации и активации МФ-ПФ. Полученные результаты расширяют современные знания о клетках, входящих в фиброгенные популяции печени, их превращении, и открывают новые возможности для клинического применения биологически активных веществ (куркумина и глиотоксина) *in vivo* при лечении заболеваний печени.

## ВЫВОДЫ

1. Получены культуры звездчатых клеток печени из фрагментов печени и культуры портальных фибробластов из крупных портальных трактов крыс *Rattus norvegicus* методом эксплантации и ферментативной обработки (проназой и коллагеназой).
2. Из результатов иммунофенотипирования следует, что звездчатые клетки печени десмин-положительные, а портальные фибробласты Thy-1-положительные при культивировании *in vitro*.
3. В процессе культивирования звездчатые клетки печени и портальные фибробласты дифференцируются в процессе культивирования в миофибробласты, экспрессирующие альфа гладкомышечный актин.
4. Установлено пролиферативное влияние TNF- $\alpha$  и инсулина на культуру клеток портальных фибробластов и увеличение биосинтеза компонентов цитоскелета ( $\alpha$ -ГМА).
5. Добавление куркумина и глиотоксина в культуру звездчатых клеток печени и портальных фибробластов оказывает дозозависимый про-апоптотический эффект и снижает биосинтез компонентов цитоскелета ( $\alpha$ -ГМА).



## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:**

1. **Миянович О.** Выделение и культивирование миофибробластов печени крыс методом эксплантации / О. Миянович, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов, А.П. Киясов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.- VII (3).-2012 . - С.112-115 (Список ВАК – авт. 0,125 п.л.).
2. **Миянович О.** Анализ миофибробластов крысы, полученных из структур портальных трактов печени методом эксплантации / О. Миянович, М.Н. Катина, А.А. Ризванов, А.П. Киясов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.-VIII(3). –2013. - С.119–124 (Список ВАК – авт. 0,1875 п.л.).

### **II. Тезисы докладов региональных и международных конференций:**

1. **Миянович О.** Роль NFκB в активации каскада клеточных реакций при фиброзе печени / О. Миянович, А. Шафигуллина // XVI Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине», секция «Фундаментальные науки»: Материалы конференции. – Казань, 2011. – С.130.
2. **Миянович О.** Иммуноцитохимический анализ фенотипа звездчатых клеток печени / О. Миянович, А. Шафигуллина // Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2012. – С.145.
3. **Mijanovic O.** The role of NF-KB in hepatic stellate cells during liver fibrosis / O. Mijanovic, A.P. Kiyasov, A.A. Rizvanov // Міжнародна наукова конференція студентів і молодих вчених «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини 19-20 квітня 2012 року»: Тезис доповідей. – 2012. – С.46-47.
4. **Mijanovic O.** The role of NF-kB in the activation of a cascade of cellular reactions in liver fibrosis / Mijanovic O. // The 4th international IMBG conference

for young scientists « Molecular biology: Advances and perspectives». - Kyiv, 2011. – p.14-17.

5. **Миянович О.** Выделение и культивирование миофибробластов печени крыс методом эксплантации / О. Миянович, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов, А.П. Киясов // Международная конференция «Биология - наука XXI века». - Москва, 2012.- С.587-589.

6. **Миянович О.** Перспективы применения куркумина при хронических гепатозах / О. Миянович, М.Н. Катина // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2014». – Москва, 2014.

7. Проттой Р.А. Качественное и количественное определение экспрессии транскрипционного фактора NF-κB в культуре миофибробластов печени крысы / Проттой Р.А., **О. Миянович**, А.А. Ризванов // I научно-практическая конференция студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии»: Сборник тезисов. – Казань, 2013. - С.104-105.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ, к. 105, отдел аттестации научно-педагогических кадров, e-mail: [RGDzjubenko@kpfu.ru](mailto:RGDzjubenko@kpfu.ru), факс 8(843) 233-78-67.